

19 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

11 N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

2 655 054

21 N° d'enregistrement national :

90 04524

51 Int Cl<sup>8</sup> : C 12 N 5/02; A 61 K 7/40, 31/12, 35/78

12

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

22 Date de dépôt : 09.04.90.

30 Priorité : 28.11.89 KR 8917275.

43 Date de la mise à disposition du public de la  
demande : 31.05.91 Bulletin 91/22.

56 Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche : Le rapport de recherche n'a pas été  
établi à la date de publication de la demande.

60 Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

71 Demandeur(s) : Société dite: PACIFIC CHEMICAL  
CO., LTD — KR.

72 Inventeur(s) : Park Soo Nam et Boo Yong Chool.

73 Titulaire(s) :

74 Mandataire : Société de Protection des Inventions.

54 Agents de protection des cellules contenant des curcuminoides.

57 La présente invention concerne des agents de protec-  
tion des cellules contenant des curcuminoïdes obtenus à  
partir de Curcuma longa L. et des agents de protection des  
cellules contenant des curcuminoïdes et de l'acide ascorbi-  
que et/ou de la superoxyde dismutase. Ces agents présen-  
tent une excellente activité de protection des cellules  
contre les espèces à oxygène actif et peuvent être utilisés  
comme matières cosmétiques.

FR 2 655 054 - A1



La présente invention concerne des agents  
5 de protection de cellules, et en particulier des  
agents de protection de cellules qui contiennent  
des curcuminoïdes dérivés de *Curcuma longa* L.. Les  
agents de protection des cellules ont une activité  
de protection de la membrane cellulaire et peuvent  
10 être utilisés avantageusement comme matières  
cosmétiques.

Il est connu que les espèces chimiques  
à oxygène actif provoquent un endommagement des cellu-  
les, des mutations, des cancers, et un vieillissement  
15 en participant à la peroxydation des lipides, à la  
dégradation des protéines et à l'altération des acides  
nucléiques (Leibovitz, B.E. et Siegel, B.W. (1980),  
J. Gerontol., 35 ; 45 ; Foote, C.S. (1982), "Pathology  
of Oxygen" (A.P. Autor, éd), Academic Press, N.Y.,  
20 21 ; Straight, R.C. et Spikes, J.D. (1985), "Singlet  
Oxygen, Vol IV, Reaction Modes and Product, Part  
2" (Frimer, A.A. éd.)).

Les espèces chimiques à oxygène actif peuvent  
comprendre l'oxygène singulet, le radical hydroxyle, le  
25 radical anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène  
etc., et des recherches poussées sur des produits  
chimiques ou des enzymes permettant de les inactiver  
ou de les piéger sont en cours.

Il a déjà été signalé que le  $\beta$ -carotène  
30 (Foote, C.S. et Denny, (1968), J. Am. Chem. Soc.,  
90 ; 6233) ou l' $\alpha$ -tocophérol (Fahrenholtz, S.R. et  
Doleiden, F.H. (1974), photochemistry and photobiology,  
20 ; 505-509) présente une activité d'inactivation  
efficace contre l'oxygène singulet, ce qui a une  
35 grande importance biologique dans les cellules de

la peau qui ont fréquemment l'occasion d'être exposées à la lumière solaire.

Comme agent de piégeage pour le radical hydroxyle qui est connu pour être le plus réactif parmi les espèces à oxygène actif, on peut citer par exemple le mannitol (Martin, J.P. et Logsdon, N. (1987), J. Biol. Chem. 262, 15 ; 7213-7219), le tryptophane, le formiate, le t-butanol, l'éthanol (Bors, W. et Michel, C. (1977) Eur. J. Biochem., 95 ; 621-627) etc. A l'heure actuelle, des études poussées sur la superoxyde dismutase, une enzyme de l'organisme vivant transformant le radical anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène, sur la catalase, une enzyme de l'organisme vivant décomposant le peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène et sur la glutathion peroxydase sont en cours en relation avec le vieillissement (Hans Nohl et Dietmar Hegner (1979), Mechanisms of Ageing and Development, II ; 145-151).

En outre, les curcuminoïdes de Curcuma longa L. peuvent comprendre la curcumine, le 4-hydroxy cinnamoyl (feruloyl) méthane (désignés parfois ci-après par "HCFM"), le bis (4-hydroxy cinnamoyl) méthane (parfois désigné ci-après par "BHCM") etc., et ils sont utilisés comme pigments comestibles en raison de leur haute sécurité biologique. Récemment, leur activité anti-oxydante (shizuo Toda, Toshio Miyase, Hideko Arichi, Hisayuki Tanizawa et Yoshio Tokino (1985), Chem.. Pharm. Bull. 33(4) ; 1725-1728) et leur activité anti-inflammatoire (Srimal, R.C. et B.N. Dhawan (1973), J. of pharm. pharmc., 25 ; 447-452) ont été signalées.

Jusqu'à présent, cependant, on n'a effectué aucune recherche et aucun développement sur les agents de protection des cellules contre les espèces à oxygène

actif contenant des curcuminoïdes, car la réaction biochimique provenant des espèces à oxygène actif n'est pas complètement élucidée, et par conséquent, les études sur les inhibiteurs de ces espèces sont  
5 limitées au  $\beta$ -carotène, à l' $\alpha$ -tocophérol qui réagissent photochimiquement et directement avec elles. En outre, on considère que le fait qu'aucun procédé expérimental quantitatif et biochimiquement-biologiquement significatif pour déterminer l'activité de protection  
10 des cellules des curcuminoïdes n'a été établi dans la pratique, contribue à cet état de choses.

La demanderesse est partie de l'idée que l'activité anti-oxydante des curcuminoïdes refléterait leur réaction physicochimique directe avec les espèces  
15 à oxygène actif et que leur activité anti-inflammatoire résulterait de leur participation à la réaction biochimique provenant des espèces à oxygène actif, et elle a mis au point des agents de protection des cellules contre les espèces à oxygène actif contenant des  
20 curcuminoïdes en utilisant le procédé de mesure de l'activité de protection des cellules mis au point par elle dans le brevet n° 90.00935, accomplissant ainsi la présente invention.

Par conséquent, le but de la présente invention est de fournir pour la première fois des agents  
25 de protection des cellules contre les espèces à oxygène actif contenant des curcuminoïdes.

Un autre but de la présente invention est d'identifier l'excellent effet de protection des  
30 cellules des curcuminoïdes en comparant leur activité à celle d'autres agents de protection des cellules connus au moyen du procédé ci-dessus.

Un autre but de la présente invention est de fournir des agents de protection des cellules  
35

plus efficaces en découvrant une synergie qui puisse augmenter l'activité de protection des cellules des curcuminoïdes.

5 L'expérience importante du point de vue biochimique-biologique de photohémolyse des érythrocytes publiée par la demanderesse dans le brevet n° 90.00935 a été utilisée pour mesurer quantitativement l'activité de protection des cellules des curcuminoïdes contre les espèces à oxygène actif.

10 A la suite de ces études, la demanderesse a trouvé que des curcuminoïdes tels que la curcumine, le 4-hydroxy cinnamoyl (feruloyl) méthane, le bis (4-hydroxy cinnamoyl) méthane etc., ont une forte activité de protection des cellules vis-à-vis des  
15 espèces à oxygène actif nuisibles.

La demanderesse a trouvé que cette très forte activité de protection des cellules des curcuminoïdes pouvait être attribuée au fait qu'une réaction biochimique secondaire autre que la réaction d'altération physicochimique directe par les espèces à oxygène  
20 actif entraine en jeu dans la photohémolyse des érythrocytes et que les curcuminoïdes, non seulement réagissent directement par voie physicochimique avec les espèces à oxygène actif, mais encore jouent un rôle  
25 important dans la réaction biochimique secondaire. Il est également considéré que la forte activité de protection des cellules des curcuminoïdes contre les espèces à oxygène actif nuisibles est en relation étroite avec leur activité anti-inflammatoire.

30 En outre, la demanderesse s'attend à ce que l'activité de protection des cellules des curcuminoïdes contre les espèces à oxygène actif nuisibles soit fortement augmentée par l'addition d'acide ascorbique ou de superoxyde dismutase. La

35

demanderesse a examiné l'effet synergique de l'acide ascorbique ou de la superoxyde dismutase dans l'activité de protection des cellules des curcuminoïdes en suivant la méthode expérimentale décrite dans l'exemple 1, et elle a obtenu les résultats figurant dans le tableau 1.

**Tableau 1**

**10** Activité de protection des cellules de curcuminoïdes, de L'acide ascorbique (AA) ou de la superoxyde dismutase (SOD) ou de mélanges de ceux-ci.

15	Echantillon et concentration finale	Temps nécessaire pour que 50% de $6 \times 10^7$ érythrocytes soient lysés par l'oxygène actif (min)
20	curcumine 25 $\mu$ M	55
	AA 100 $\mu$ M	32
	curcumine 25 $\mu$ M + AA 100 $\mu$ M	102
	BHCM 25 $\mu$ M	62
	BHCM 25 $\mu$ M + SOD 50 $\mu$ g/ml	72
	HCFM 25 $\mu$ M	72
	HCFM 25 $\mu$ M + SOD 50 $\mu$ g/ml	85
	SOD 50 $\mu$ g/ml	32
	SOD 100 $\mu$ g/ml	32
25	curcumine 25 $\mu$ M + SOD 100 $\mu$ g/ml	70
	témoin	32

30 Comme le montre le tableau 1, les activités de protection des cellules contre les espèces à oxygène actif ont été augmentées d'une manière significative par l'addition d'acide ascorbique ou de superoxyde dismutase dans une quantité de 100 $\mu$ M ou de 50-100 $\mu$ g/ml respectivement à 25 $\mu$ M de curcuminoïdes.

35

On a trouvé que l'acide ascorbique protégeait synergiquement les cellules en inhibant l'oxydation de la curcumine.

La superoxyde dismutase est une enzyme  
5 qui est présente dans le cytoplasme ou les mitochondries des organismes et qui élimine l'oxygène actif  $O_2^-$  nuisible en protégeant les cellules contre l'altération par oxydation. On considère que dans les agents protecteurs des cellules contenant les curcuminoïdes  
10 et la superoxyde dismutase conformes à l'invention, les curcuminoïdes protégeraient les cellules en transformant l'oxygène actif  $O_2^-$  nuisible en  $O_2$  moins nuisible, et qu'ensuite la superoxyde dismutase éliminerait le  $O_2^-$ , protégeant ainsi synergiquement les  
15 cellules.

Dans la présente invention, les concentrations des curcuminoïdes dans les agents de protection des cellules ne sont pas déterminantes. Lorsque l'agent  
20 contient le curcuminoïde, plus de la superoxyde dismutase et/ou de l'acide ascorbique, leurs proportions, bien que n'étant pas particulièrement limitées, sont par exemple telles que 8g de la superoxyde dismutase ou 2,8g (16,0mmol) d'acide ascorbique sont dissous dans 1,0l d'eau et que l'on y ajoute une solution  
25 de 1,48g (4,0mmol) de curcumine, 1,86g (4,0mmol) de HCFM ou 1,24g (4,0mmol) de BHCM dans 20ml d'éthanol.

La présente invention sera décrite d'une manière plus détaillée en se basant sur les exemples suivants.

30 Exemple 1. Mesure de l'activité de protection des cellules des curcuminoïdes contre les espèces à oxygène actif.

1) Préparation des échantillons.

On dissout un curcuminoïde ou un composé  
35 phénolique choisi parmi la curcumine, le 4-hydroxy cinnamoyl (féruloyl) méthane (HCFM), le bis(4-hydroxy

cinnamoyl) méthane (BHCM), l'acide cinnamique, l'acide paracoumarique, l'acide férulique, l'acide sinapique, l'acide chlorogénique, l'acide caféique, le gallate de propyle, l'azine de la vanilline, la capsaïcine, la braziline, l'hématoxyline ou le triphénylphénol, ou l' $\alpha$ -tocophérol en tant qu'antioxydants connus dans une quantité de 4mmol chacun dans 1,0 l l'éthanol pour obtenir des échantillons.

## 2) Mesure.

On centrifuge le sang d'un lapin à 8000 t/min pendant 5 min et on le lave pour obtenir des érythrocytes que l'on dilue avec du sérum physiologique pour préparer la suspension d'érythrocytes ( $6 \times 10^7$  érythrocytes / 3,5ml). On prépare 6 tubes à essai de Pyrex de 10ml de 1,0cm de diamètre et on introduit dans chacun 3,5ml de la suspension. On prend 3 des 6 tubes à essai comme groupe témoin et on y ajoute respectivement 50 $\mu$ l d'éthanol. On prend les 3 tubes à essai restant comme groupe d'essai, et on y ajoute respectivement 50 $\mu$ l d'échantillon, puis on les fait préincuber à l'obscurité pendant 30min. Lorsque la préincubation est terminée, on y ajoute 0,5ml d'une solution aqueuse de rose bengale (12 $\mu$ M) comme photosensibilisant et on scelle les ouvertures de chacun des tubes à essai avec un film revêtu de paraffine. Dans une boîte hexahédrique rectangulaire de 50x20x25cm dont l'intérieur a été peint dans une couleur foncée, et équipée d'une lampe fluorescente de 20W, on dispose les tubes à essai en un point distant de 5cm de la lampe et on les irradie pendant 15min. Le but de l'addition de photosensibilisant et de l'irradiation est de produire des espèces à oxygène actif.

Lorsque l'irradiation est terminée, on mesure la transmittance de chaque tube à essai à 700nm à des intervalles de 15min à l'obscurité. L'aug-



mentation de la transmittance de la suspension d'érythrocytes à cette longueur d'onde est proportionnelle au degré d'hémolyse des érythrocytes.

Chacun des stades de l'expérience ci-dessus  
5 a été effectué dans une salle à température constante de 27°C. L'activité de protection des cellules contre les espèces à oxygène actif de l'échantillon a été définie comme le temps de demi-hémolyse (min), c'est-à-dire le temps nécessaire pour que 50% des  
10 érythrocytes ajoutés dans les conditions de mesure ci-dessus soient photohémolysés.

### 3) Résultats.

Les résultats sont donnés dans le tableau  
2, qui montre que des curcuminoïdes comme la curcumine,  
15 le HCFM, le BHCM présentent une excellente activité de protection des cellules.

20

25

30

35

5

Tableau 2

Effet de protection des cellules des curcuminoïdes et des composés phénoliques contre les espèces à oxygène actif.

10	Echantillon	Temps de demi-hémolyse (min)
15	curcuminoïdes curcumine HCFM BHCM	145 240 180
20	acide cinnamique acide paracoumarique acide férulique acide sinapique acide chlorogénique acide caféique gallate de propyle azine de la vanilline capsaïcine braziline hématoxyline triphénylphénol	32 32 32 32 32 32 34 48 65 57 98 120
25	$\alpha$ -tocophérol	45
30	témoin	32

\* Concentration finale des échantillons : 50 $\mu$ M.

35

Exemple 2. Effet synergique de l'acide ascorbique et/ou de la superoxyde dismutase sur l'activité de protection des cellules des curcuminoïdes.

5 Pour examiner l'effet synergique de l'acide ascorbique et/ou de la superoxyde dismutase sur l'activité de protection des cellules des curcuminoïdes, on a effectué les mêmes expériences que dans l'exemple 1 en utilisant les divers échantillons indiqués dans le tableau 3.

10 Les résultats sont donnés dans le tableau 3, qui montre que les agents de protection des cellules contenant les curcuminoïdes en même temps que de l'acide ascorbique et/ou de la superoxyde dismutase conformes à l'invention ont un effet de protection  
15 des cellules contre les espèces à oxygène actif plus élevé que l'agent de protection des cellules connu, l' $\alpha$ -tocophérol.

20

25

30

35

5

**Tableau 3**  
**Effet synergique de l'acide ascorbique (AA) et/ou de la**  
**superoxyde dismutase (SOD) sur l'activité de protection**  
**des cellules des curcuminoides.**

10

	Echantillon et concentration finale	Temps de demi-hémolyse (min)
15	curcumine (50 $\mu$ M) + SOD (350 UI/mL) HCFM (50 $\mu$ M) + AA (0,2mM) BHCFM (50 $\mu$ M) + SOD (350 UI/mL) + AA (0,2mM)	>300 >300 >300
20	curcumine (50 $\mu$ M) HCFM (50 $\mu$ M) BHCFM (50 $\mu$ M)	145 240 180
25	SOD (350 UI/mL) AA (0,2mM)	32 32
	$\alpha$ -tocophérol (50 $\mu$ M)	45
30	témoin	32

35

**REVENDICATIONS.**

1. Agent de protection des cellules contre les espèces à oxygène actif, caractérisé en ce qu'il  
5 comprend un curcuminoïde obtenu à partir de *Curcuma longa* L..

2. Agent de protection des cellules suivant la revendication 1, caractérisé en ce que le curcuminoïde est choisi parmi la curcumine, le 4-hydroxy  
10 cinnamoyl (féruloyl) méthane et le bis(4-hydroxy cinnamoyl)méthane.

3. Agent de protection des cellules contre les espèces à oxygène actif, caractérisé en ce qu'il comprend un curcuminoïde obtenu à partir de *Curcuma*  
15 *longa* L., de l'acide ascorbique et/ou de la superoxyde dismutase.